


②

APPARATUS FOR IMMOBILIZED DNA LIBRARY PREPARATION, APPARATUS FOR GENE AMPLIFICATION, METHOD FOR TEMPERATURE CONTROL AND METHOD FOR COMPARING GENES SYSTEMATICALLY

Patent Number: ☐ EP1054056
 Publication date: 2000-11-22
 Inventor(s): TANGA MICHIFUMI (JP); TAKAHASHI KOJIRO (JP)
 Applicant(s): TOYO KOHAN CO LTD (JP)
 Requested Patent: ☐ WO9941362
 Application Number: EP19990901956 19990208
 Priority Number(s): WO1999JP00525 19990208; JP19980042971 19980210
 IPC Classification: C12N15/00; C12M1/00; C12M1/36; C12Q1/68
 EC Classification: B01J19/00C, B01L3/00C6C2, B01L7/00D
 Equivalents: AU2187299, AU747296, CA2320389
 Cited Documents:

Abstract

A purpose of the present invention is to provide a gene amplification apparatus with simple operation, wherein the apparatus can heat and cool gene rapidly and a thermal cycle can be operated in a relatively short period and a method thereof, a method for preparing immobilized DNA library suitable to the above apparatus and a method for comparing genes systematically. The apparatus for preparing immobilized DNA library according to the present invention comprises a reaction body 10 on which a grooved portion for receiving a container is formed, a cap portion 50 provided at an upper portion of the reaction body and a container 12 formed by substrates for immobilizing DNA, wherein the cap portion 50 including means for heating/cooling 51 and means for cooling 52. In the apparatus, a computer control portion 64 compares a signal from a temperature measuring portion 61 and a program chart so that a temperature control portion 62 of the means for heating/cooling 51 and a temperature control portion 63 of the means for cooling 52 are driven. A plurality of DNA library in which genes are immobilized on surfaces of diamond substrates are set in the container so as to compare genes systematically. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/00, C12M 1/00, 1/36, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/41362</p> <p>(43) 国際公開日 1999年8月19日(19.08.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00525</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月8日(08.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/42971 1998年2月10日(10.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋鋼板株式会社(TOYO KOHAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8911 東京都千代田区霞が関一丁目4番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 高橋浩二郎(TAKAHASHI, Kojiro)(JP/JP) 〒734-0015 広島県広島市南区宇品御幸一丁目9番26号 Hiroshima, (JP) 丹花通文(TANGA, Michifumi)(JP/JP) 〒744-8611 山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 太田明男(OHTA, Akio) 〒100-8911 東京都千代田区霞が関一丁目4番3号 東洋鋼板株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: APPARATUS FOR IMMOBILIZED DNA LIBRARY PREPARATION, APPARATUS FOR GENE AMPLIFICATION, METHOD FOR TEMPERATURE CONTROL AND METHOD FOR COMPARING GENES SYSTEMATICALLY</p> <p>(54) 発明の名称 固定化DNAライブラリー作製装置、遺伝子増幅装置、温度制御方法及び遺伝子を系統的に比較する方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method and an apparatus for gene amplification which can be used for carrying out heating and cooling speedily and accordingly performing a heat cycle in a short time, and also is easy to handle, a method for preparing an immobilized DNA library suitable for use in this apparatus, and a method for comparing genes systematically. The apparatus for preparing an immobilized DNA library of the present invention comprises a reactor main body (10) having recesses parts for setting containers therein, a lid part (50) having a heating and cooling means (51) and a cooling means (52) above the reactor body, and containers (12) composed of substrates (41) with immobilized genes. In the apparatus, a signal from temperature measuring part (61) is compared by a computer control part (64) with a program chart, and a temperature control part (62) of a heating and cooling means and a temperature control part (63) of a cooling means (52) are rendered to act by the computer control part. Further, a plurality of DNA libraries are set in containers, to perform systematic comparison of genes.</p> <div data-bbox="665 1302 1429 1890"> </div>		

本発明は、昇温や冷却が迅速で、熱サイクルを短時間で行える操作が簡単な遺伝子増幅装置及び遺伝子増幅方法、この装置に好適に用いられる固定化DNAライブラリー作成方法、遺伝子を系統的に比較する方法を提供する。本発明の固定化DNAライブラリー作成装置は、容器を挿入する凹部を有する反応器本体10と、この反応器本体上部に加熱・冷却手段51、冷却手段52を設けた蓋部50と、遺伝子を固定した基体41で構成される容器12から成る。この装置は、温度測定部61からの信号をコンピューター制御部64がプログラムチャートと比較し、加熱・冷却手段51の温度制御部62と冷却手段52の温度制御部63とを駆動させる。また、ダイヤモンド基体表面に遺伝子を固定した複数のDNAライブラリーを容器内に設定し、遺伝子を系統的に比較する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シェラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	ML モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴリア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	MX メキシコ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NO ノルウェー	
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	RU ロシア	
EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン	
		SE スウェーデン	

明 細 書

固定化DNAライブラリー作製装置、遺伝子増幅装置、温度制御方法及び遺伝子を系統的に比較する方法

5

技術分野

本発明は、遺伝子工学、蛋白質工学、細胞工学、発生工学、免疫学等の、分子生物学関連分野や生化学関連分野等において、微量の溶液で加熱を伴う各種反応に使用する反応装置に関する。より詳しくは、固定化DNAライブラリー作製方法、遺伝子増幅方法、遺伝子を系統的に比較する方法及びそれらに用いる装置、
10 さらにはそれに用いる固定化DNAライブラリーに関する。

背景技術

従来、遺伝子増幅する手段として、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）法が広く用いられている。このPCR法は、反応溶液をいれたチューブ状のプラスチック反応容器をアルミブロックなどの中に挿入し、反応溶液の水分蒸発を防止するため蓋をし、アルミブロックの温度を、熱変性温度、アニーリング温度、DNA合成温度の順に熱サイクルを所定の回数コントロールするというものである。
15

しかしながら、このような従来のPCR法に用いられた装置では、熱容量が大きく熱伝導性が悪いプラスチック反応容器が用いられており、しかもアルミブロック自体を温度コントロールするため、昇温や冷却に時間がかかるという問題点があった。
20

また、反応溶液の温度制御が完全ではないため、目的とするDNAの複製収量が低いという問題点もあった。
25

本発明は、上記問題点に鑑み、操作が簡単で、昇温や冷却を迅速に行え、反応

の熱サイクルを短時間で行える遺伝子増幅装置及び遺伝子増幅方法を提供することを技術的課題とする。

また、このような装置に用いることが好適なDNAを固定化した基体及び固定化DNAライブラリー作製方法を提供することも、本発明の技術的課題である。

5 さらに、上記装置を用いて遺伝子を系統的に比較をする方法を提供することも、本発明の技術的課題である。

発明の概要

本発明の固定化DNAライブラリー作製装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されていることを特徴とする。

本発明の遺伝子増幅装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されていることを特徴とする。

本発明の遺伝子増幅装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、遺伝子を固定化した基体で形成されていることを特徴とする。

これらの装置は、前記基体が、固体状の基体であることが望ましく、前記容器が分解型であることが望ましく、前記容器がカセット型であることが望ましい。

本発明の遺伝子増幅装置の温度制御方法は、温度測定部61からの信号をコンピュータ制御部64に入力し、コンピュータ制御部64は予め入力されたプログラムチャートと比較し、加熱・冷却手段51の温度制御部62と冷却手段52の温度制御部63とを駆動させることを特徴とする。

本発明のDNAを固定化した基体は、これらの装置で用いる基体であることを特徴とする。

本発明の基体を冷凍保存する方法は、DNAを固定化した基体を冷凍保存することを特徴とする。

5 本発明の遺伝子を系統的に比較する方法は、複数の固定化DNAライブラリーを容器内に設置してするものであることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の遺伝子増幅装置を開蓋した状態を示す概略平面図である。図
10 2は、図1のA-A断面概略図である。図3は、図1のB-B断面概略図である。
図4は、容器の組立概略図である。図5は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態
を示す概略断面図である。図6は、本発明の遺伝子増幅装置の温度制御を示す概
略図である。図7は、固定化cDNAライブラリーの作成及び遺伝子増幅の説明
図である。図8は、固定化gDNAライブラリーの作成及び遺伝子増幅の説明図
15 である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子増幅装置を図面を用いて説明する。

図1は、本発明の遺伝子増幅装置を開蓋した状態を示す概略平面図である。図2
20 は、図1のA-A断面概略図である。図3は、図1のB-B断面概略図である。
図4は、容器の組立概略図である。図5は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態
を示す概略断面図である。

図1～図3において、10は反応器本体、11は反応器本体内に形成された凹
部である。反応器本体10は、化学的に安定な、たとえばアクリル樹脂、ポリス
チレン樹脂等の高分子材料で形成されることが望ましい。凹部11は反応器本体
25 内に少なくとも1個設けられており、たとえば、円筒状、三角もしくは四角等の

多角柱状などのものが好ましい。

容器 1 2 は、熱伝導性のよい基体 4 1、たとえばダイヤモンド基体、窒化アルミ、炭化珪素などのセラミクス基体や、アルミニウム、ステンレススチール等の金属基体から構成されていることが好ましい。

- 5 あるいは、一部にダイヤモンドが形成されたダイヤモンドライク・カーボン、炭素、炭素化合物なども好ましい。また、ポリカーボネートやフッ素樹脂等のプラスチック基体等も好ましい。さらに上記基体を組み合わせたもので形成されていることも好ましい。

- 10 容器 1 2 は底付きのものであればよく、凹部 1 1 に埋設・取外しが容易に行えることが好ましい。

- また、容器 1 2 は、基体 4 1 を底や側壁を分解型にしておくことも好ましく、たとえば四角柱状の容器であれば、底 1 枚、側壁 4 枚の基体に分解できる。たとえば図 4 の (a) に示すように、一辺が 5 ~ 10 mm 程度で厚みが 0.1 mm 程度の基体 4 1 を、たとえば (b) に示すように、合成樹脂製の基体ホルダー 4 2 15 内の底 4 3 と側壁 4 4 とに組み立てて容器 1 2 とすることができる ((c) 参照)。

この場合、容器 1 2 は、底、側壁の少なくとも 1 枚は上記基体上に遺伝子を固定化したもので形成されているものを用いることが好ましい。

- さらに、これらの容器をいくつか連結して (カセット型)、複数の容器を複数 20 の凹部 1 1 にワンタッチで埋設・取外しできるようにして、操作の効率化を図ることもできる。このカセット型の具体的態様については後述の固定化 DNA ライブラリーの部分で詳述する。

- 図 5 は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態を示す概略断面図である。図 5 において、(a) は、反応器本体 1 0 の上部に蓋部 5 0 を設置する態様を示した概略説明図である。(b) は、図 5 の (a) に示す C—C 断面概略図である。図 5 25 において、5 0 は蓋部、5 1 は加熱・冷却手段、5 2 は冷却手段を示す。蓋部 5

0 は、化学的に安定な、たとえばアクリル樹脂、ポリスチレン樹脂等の高分子材料で形成されることが望ましい。

加熱・冷却手段 5 1 は、容器 1 2 と接触して容器 1 2 を加熱・冷却する手段であり、ペルチェ素子、電熱ヒータ、赤外線ランプ等を用いるのが好ましい。この
5 加熱・冷却手段 5 1 を、容器 1 2 と直接的に接触させて設置することによって容器 1 2 の温度を直接的に制御できるので、従来の増幅装置よりも温度制御精度がよい。冷却手段 5 2 は、冷却水や冷風を流通させるパイプや冷却ファンを設置したユニットであり、容器 1 2 を急速に冷却するための手段である。

図 6 は、本発明の遺伝子増幅装置の温度制御を示す概略図である。図 6 において、容器 1 2 の温度制御は、温度測定部 6 1 からの情報に基づき加熱・冷却手段
10 5 1 の温度制御部 6 2 と冷却手段 5 2 の温度制御部 6 3 とによって行われる。すなわち容器 1 2 の底もしくは側壁に直接的に接して設けられた温度測定部 6 1 からの信号をコンピュータ制御部 6 4 に入力し、コンピュータ制御部 6 4 は予め入力されてあるプログラムチャート（昇温速度、保持温度、保持時間、降温速度
15 等）と比較し、加熱・冷却手段 5 1 の温度制御部 6 2 と冷却手段 5 2 の温度制御部 6 3 を駆動させる。

実施例

本発明の実施例を図 7 及び図 8 を用いてさらに詳細に説明する。

容器 1 2 として 5 mm 四方（厚さ 0. 1 mm）のダイヤモンドチップ 4 1 をダイ
20 ヤモンド基体として用いた。このダイヤモンドチップ 4 1 を、底に 1 枚と側壁に 4 枚使用して、図 4 に示すように、合成樹脂製の基体ホルダー 4 2 の側壁に組み立てて容器 1 2 とした。この側壁に使用したダイヤモンドチップ 4 1 にはすでに有機カルボン酸で化学修飾済みのものを用いた。その後蓋部 5 0 を、反応器本体
1 0 上部に設置した。

25 （固定化 DNA ライブラリーの作製）

次に、固定化 DNA ライブラリーの作製例を図 7、図 8 を用いて説明する。ま

ず、有機カルボン酸で化学修飾した4枚のダイヤモンドチップ41を用いて構成した容器12内の溶液と接触するダイヤモンドチップ41表面に、mRNA (messenger RNA:メッセンジャーRNA)の場合はオリゴ-dT₁₆₋₂₀を、一方gDNA (genomic DNA:染色体DNA)の場合は目的の制限酵素部位を持ったオリゴヌクレオチドを、まず化学的なエステル結合反応によって固定化した(図7、図8参照)。これらの固定化反応のためには、オリゴ-dT₁₆₋₂₀では3'末端側及びオリゴヌクレオチドでは5'末端側がアミノ基を有するアデニン(A)かシトシン(C)であることが要求される。なお、図7、図8において、“ADC-R”で示す記号は、有機カルボン酸を化学修飾したダイヤモンドチップを表す。

次に、cDNA (complementary DNA) ライブラリーでの場合は、組織・細胞から抽出した全RNA溶液を加えて0~4℃の低温でmRNAを固定化オリゴ-dT₁₆₋₂₀にハイブリダイズさせた後に、37~60℃の範囲内での適当な一定温度で逆転写酵素 (Reverse Transcriptase: RT) によってcDNA合成を行った。このときのcDNAは、固定化オリゴ-dT₁₆₋₂₀の5'へ向けての延長反応させ固定化したものを用いた。

合成された固定化cDNAとmRNAとのハイブリダイズ状態にある溶液を90℃に昇温させてmRNAを脱ハイブリダイズした後、反応溶液をTris-EDTA (TE) 緩衝液に交換し、再度0~4℃の低温にしてエタノール洗浄し、一本鎖DNAの状態の精製された固定化cDNAライブラリーを作製した(図7参照)。

gDNAライブラリーでの場合は、まず、目的の制限酵素部位を持った固定側オリゴヌクレオチド(図8参照)を上記のオリゴ-dT₁₆₋₂₀の場合と同様にダイヤモンドチップ41の表面に固定化した。次に、その化学的な固定化のための反応溶液を0~4℃の低温でハイブリ側オリゴヌクレオチドと目的の制限酵素を含む反応溶液に交換した。そして、オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション後、37℃にまで昇温して半固定化されたオリゴヌクレオチドの制限酵素切

断を行った。

制限酵素切断後に、再度反応容器を0～4℃の低温にして、目的の制限酵素で断片化したgDNAとライゲーション酵素（Ligase）を含む反応溶液に交換し、再び温度を37℃にまで上昇させてライゲーション反応を行い、一本鎖DNAの状態のgDNAライブラリーを作製した（図8参照）。

なお、ダイヤモンドチップ41の表面上に上記作製された固定化cDNAライブラリー或いは上記作製された固定化gDNAライブラリーを、

- ①多検体での同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較、
 - ②同一検体での各組織・細胞の遺伝子発現変動の比較、
 - 10 ③同一検体での治療・手術等に伴う余後経過に対応する遺伝子発現変動の比較、
- 等を目的として、それぞれを別の容器内に設置することができる。

たとえば①の場合は、同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較をするために、多検体（固定化DNAライブラリーを有した複数のダイヤモンドチップ）を、別の容器中に設置し、これらの複数の容器を連結した1カセットとする。そしてこれらのカセットを反応器本体に埋設する。さらにこれらのカセットを2カセット以上を系統的に作れば、効率的に多検体の比較を行うことができる。

本発明では、これらの複数の容器を連結した1カセットあるいは複数のカセットを集合体にして、これらのそれぞれの容器内に固定化DNAライブラリーを設置したものを、カセット型固定化DNAライブラリーとする。本発明ではこれらのカセット型固定化DNAライブラリーを用いて、前記①～②の比較を系統的に行うことによって、遺伝子の変動を効率的に調査できる。

そして、このカセット型固定化DNAライブラリーは、PCR過程に供しなかった場合でも供した場合でも、その容器をTE緩衝液及び70～75%のエタノール水溶液で十分に洗浄後、100%エタノールに浸潤して冷凍保存すれば、比較データ等の要求に応じて半永久的に利用可能である。

（固定化DNAライブラリーを用いての遺伝子増幅）

上記の固定化cDNAライブラリー又はgDNAライブラリーで作製したカセット型固定化DNAライブラリーで容器12の側壁を構成した。この容器12内面をTE緩衝液で十分に洗浄後、増幅目的のDNAに対するプライマーをセットし、4種のヌクレオチド及びDNAポリメラーゼを含むPCR反応溶液を加えた。

- 5 その後、容器12を、二本鎖のDNAを一本鎖DNAに分離させる熱変性温度（95℃で約1.5分間）、一本鎖DNAとDNAプライマーとを結合させるアニーリング温度（45℃で約1分間）、耐熱性DNAポリメラーゼによりDNA鎖の伸長反応を行わせるDNA増幅温度（74℃で約2分間）にそれぞれ順に温度制御し、これらの温度変化を30サイクル繰り返しPCRを行った（図7、図8
10 参照）。

- なお、多検体の遺伝子診断を一度に短時間で可能にするためには、このカセット型固定化DNAライブラリー作製・遺伝子増幅装置を必要な数だけ並列的に配置できる形のシステムを提供することで解決できる。この場合は、例えば、50試料の処理では、5組の本発明の遺伝子増幅装置を並列的に配置した形にすること
15 が好ましい。

産業上の利用可能性

- 本発明の装置を用いれば、反応容器内の反応溶液を昇温や冷却を迅速に行うことができるので、非常に短時間でDNAの増幅を行うことができる。また、自動化遺伝子診断装置にも適用可能である。すなわち、自動化遺伝子診断装置の開発
20 において技術的に最も重要な2点は、半永久的に利用可能なカセット型固定化ライブラリーの作製及び遺伝子増幅の効率・特異性の優れた遺伝子増幅装置の開発である。

- 前記の両方の問題点は、ライブラリー作製からPCRまでの一連の操作を温度
25 制御が、同一基体でもってできるという最高の利点から、現状では最も簡便、小型で高性能な形の自動化カセット型固定化DNAライブラリー作製及び遺伝子増

幅装置を提供することができる。

すなわち、本発明の装置を用いれば、DNA固定化反応の直接的な温度制御に加えて、DNAライブラリーを固定化したダイヤモンドチップをそのまま利用しての遺伝子増幅に関する直接的な温度制御も可能である。

- 5 さらに本発明の装置は、高熱伝導性のダイヤモンドなどの基体を用いてのPCR反応溶液の直接的な温度制御を行うことができるので、PCRの温度制御効率を格段に進歩させて所要時間を大幅に短縮することができるのみならず、目的DNAの特異的増幅といったPCR効率も上昇させることができる。

- 10 また、本発明の基体に高熱伝導性の基体を用いれば、高熱伝導性の他に、化学試薬に対して安定である点、耐熱性に優れている点、放射線照射によるダメージが少ない点等のダイヤモンドの特性を利用することにより、作製された固定化DNAライブラリーは非常に安定なものとなり、一度カセット型固定化DNAライブラリーを作製すれば、何度の繰返し利用も可能な半永久的なDNAライブラリーを提供することができる。

- 15 なお、ダイヤモンド基体の高熱伝導性を利用して、化学修飾していないダイヤモンド基体等のチップを本発明の増幅装置内にセットして、従来行われているPCR法を行うこともできる。

請求の範囲

1、 容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、
この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部と
5 が設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されている
固定化DNAライブラリー作製装置。

2、 容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、
この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部と
10 が設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されている
遺伝子増幅装置。

3、 容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、
この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部と
15 が設けられた装置であって、前記容器は、遺伝子を固定化した基体で形成されて
いる遺伝子増幅装置。

4、 前記基体が、固体状の基体である請求項1～3のいずれかに記載の装置。

5、 前記容器が分解型である請求項1～4のいずれかに記載の装置。

6、 前記容器がカセット型である請求項1～5のいずれかに記載の装置。

7、 請求項1～6のいずれかに記載の装置において、

温度測定部61からの信号をコンピュータ制御部64に入力し、コンピュータ制
20 御部64は予め入力されたプログラムチャートと比較し、加熱・冷却手段51の
温度制御部62と冷却手段52の温度制御部63とを駆動させる遺伝子増幅装置
の温度制御方法。

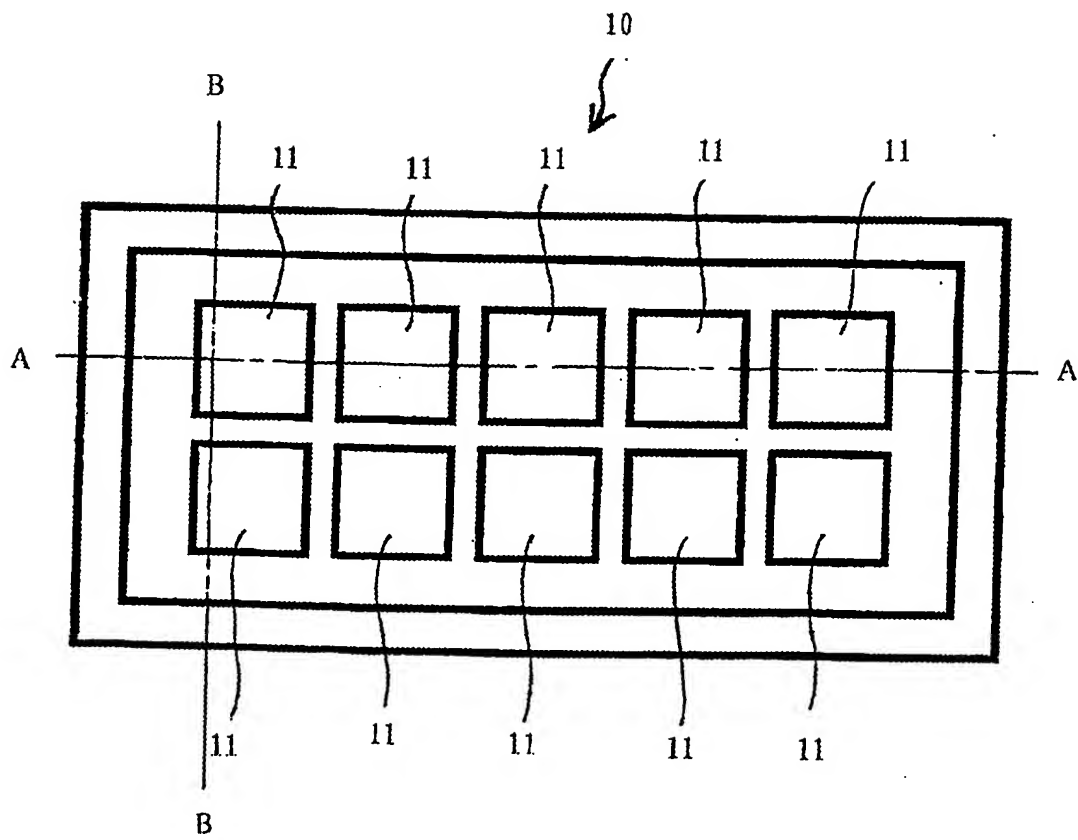
8、 請求項1～6記載のいずれかの装置で用いるDNAを固定化した基体。

9、 DNAを固定化した基体を冷凍保存する方法。

25 10、 複数の固定化DNAライブラリーを容器内に設置し、遺伝子を系統的
に比較する方法。

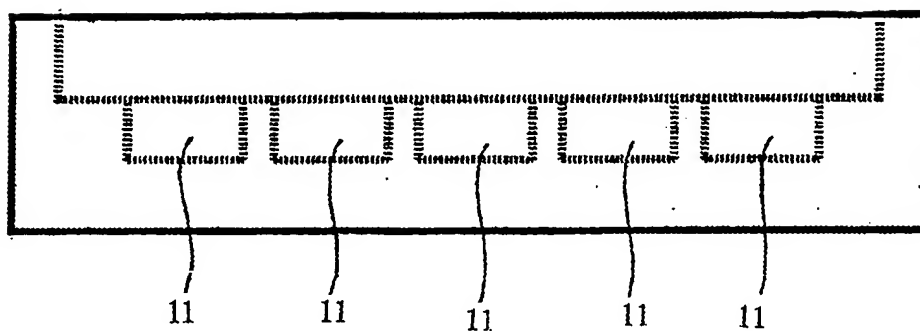
1 / 8

第1図



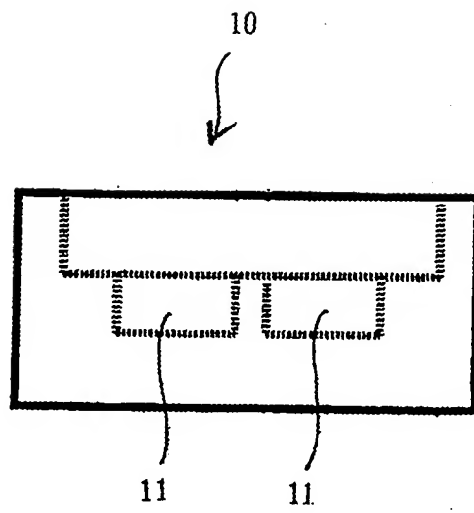
2 / 8

第2図

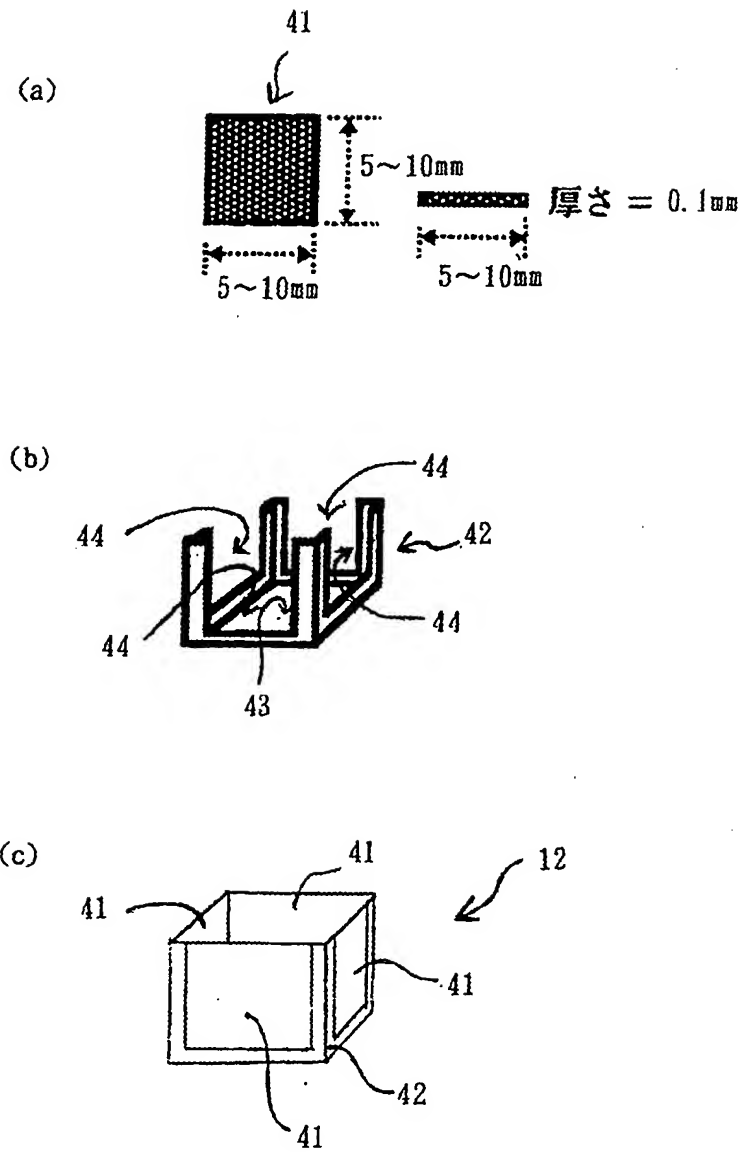
10
↓

3 / 8

第 3 図

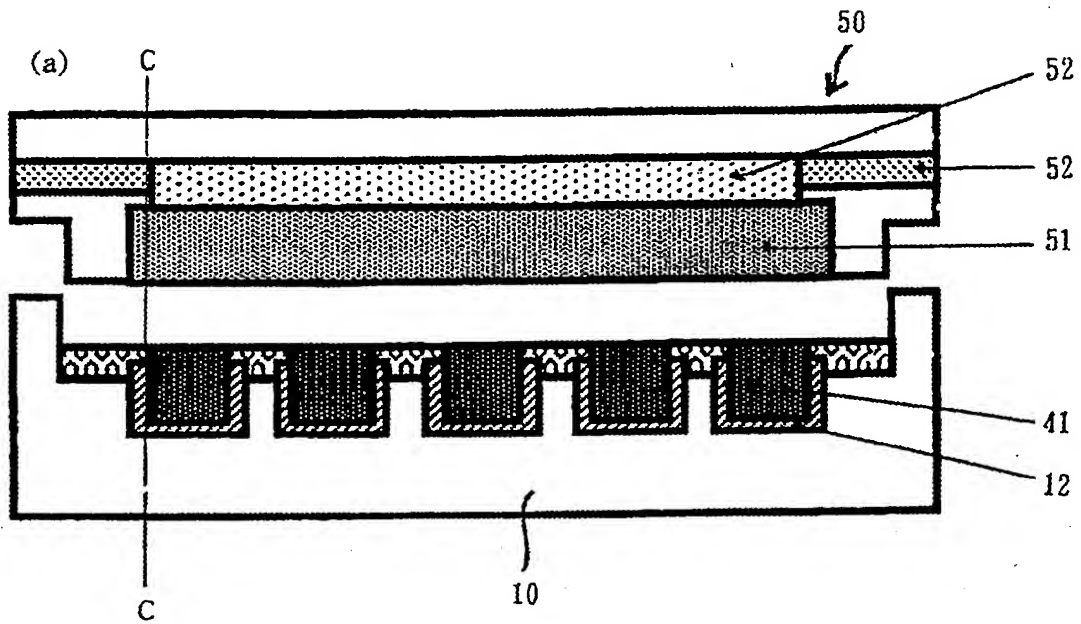


第4図

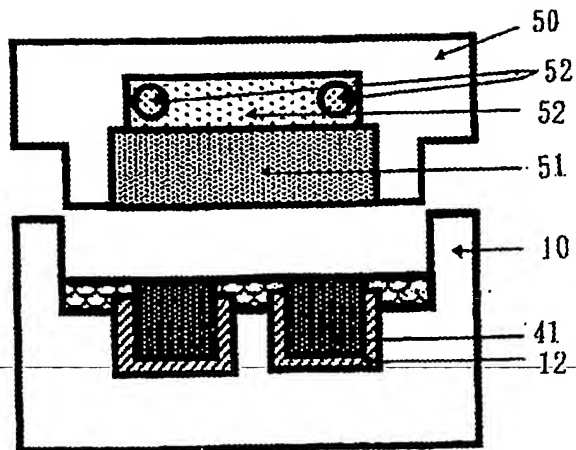


5 / 8

第5図

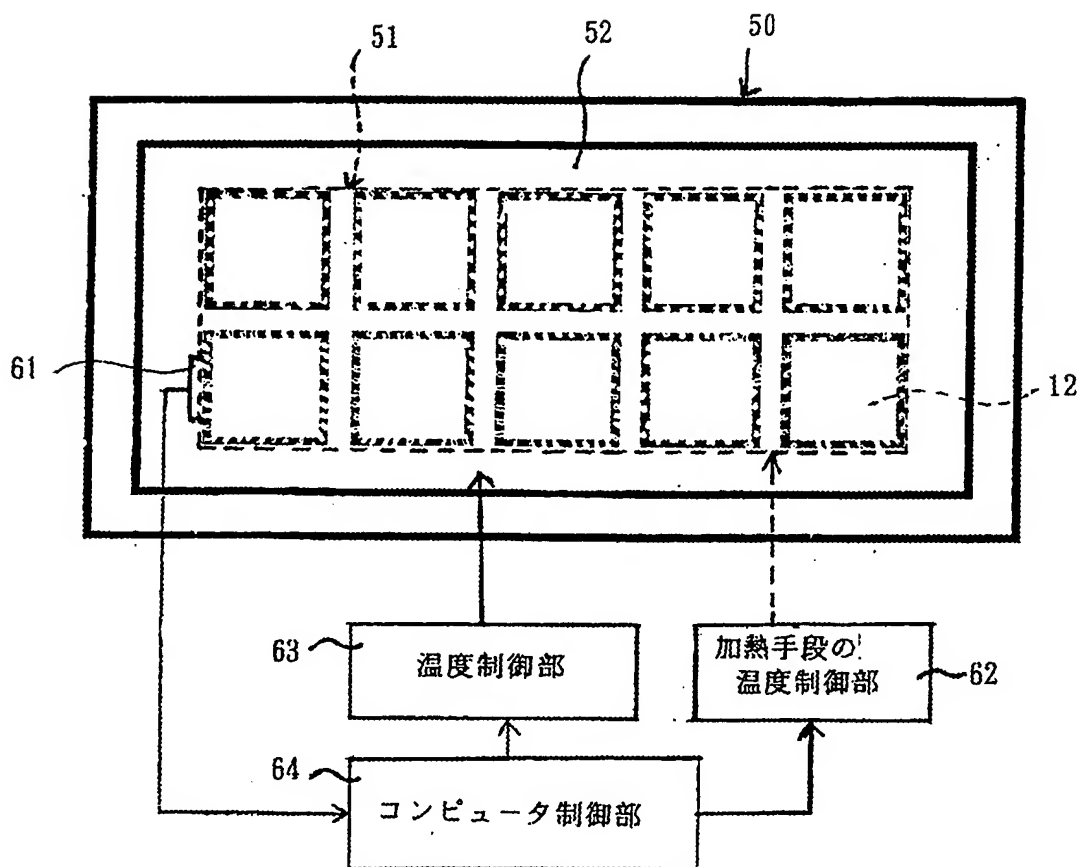


(b)



6 / 8

第6図



第7図

I. mRNAでのRT-PCRの場合

Oligo-dA₃dT₁₆₋₂₀: AAATTTTT---TTTT or Oligo-dC₃dT₁₆₋₂₀: CCCTTTTT---TTTT

[固定化(I-1)]: ADC-R-dA₃dT₁₆₋₂₀
 ADC-R-AAATTTTT---TTTT (R: -(CH₂)₃-COO)

[ハイブリダイズ(I-2)]: ADC-R-dA₃dT₁₆₋₂₀-mRNA
 ADC-R-AAATTTTT---TTTT
 AAA---AAAAAGTCAGCCATA--GTCA-(3'-mRNA-5')-GGCACAGT--AATCCG---

[RT (I-3)]: ADC-R-dA₃dT₁₆₋₂₀-cDNA-mRNA
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---
 AAA---AAAAAGTCAGCCATA--GTCA-(3'-mRNA-5')-GGCACAGT--AATCCG---

[脱ハイブリダイズ(I-3)]: ADC-R-dA₃dT₁₆₋₂₀-cDNA (固定化cDNAライブラリー)
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---

[PCR (I-4)]: ADC-R-dA₃dT₁₆₋₂₀-cDNA, Primers (P3', P5')
 (P3': GCCATA--GT) (P5': TGTCA--TTA)
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---

1st cycle: GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---

2nd Cycle: GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
CGGTAT--CAGT-----TGTCA--TTA

GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---

3rd Cycle: GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
CGGTAT--CAGT-----TGTCA--TTA

GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AAT
CGGTAT--CAGT-----TGTCA--TTA

GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AAT

GCCATA--GTCA-----GGCACAGT--AATCCG---
 ADC-R-AAATTTTT---TTTTTCAGTCGGTAT--CAGT-(3'-cDNA-5')-CCGTGTCA--TTAGGC---

第8図

II. 染色体 DNA (gDNA) でのPCRの場合

*Bam*HI: (固定側) AAA(T/G)₁₋₁₁ GGATCC(T/G)₁₋₃ *Eco*RI: (固定側) AAAGG(T/G)₁₋₁ GAATTC(T/G)₁₋₃
 (ハイブリ側) TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAGG(A/C)₁₋₃ (ハイブリ側) TTTCC(A/C)₁₋₁ CTTAAG(A/C)₁₋₃

[固定化 (II-1)]:

ADC-R-AAA(T/G)₅₋₁₀ GGATCC(T/G)₂₅

[ハイブリダイズ(II-2)]:

ADC-R-AAA(T/G)₅₋₁₀ GGATCC(T/G)₂₅
 TTT(A/C)₅₋₁₀ CCTAGG(A/C)₂₅

[制限酵素切断 (II-3)]:

AD C-R-AAA(T/G)₁₋₁₁ G
 TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAG

[ライゲーション (II-4)]:

ADC-R-AAA(T/G)₁₋₁₁ G GATCCATGGCCTTACGCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---
 TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAG GTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGTAC---

ADC-R-AAA(T/G)₅₋₁₀ GGATCCATGGCCTTACGCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---
 TTT(A/C)₅₋₁₀ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGTAC---

[PCR (II-5)]: ADSC-Oligo-制限酵素部位-gDNA (gDNA ライブラリー), Primers (P5', P3')

(P5': GCGT--AACCGT)

ADC-R-AAA(T/G)₁₋₁₁ GGATCCATGGCCTTACGCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---
 TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGTAC---
 (P3': ACG--CATGGT)

1st Cycle:

-T(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGT
 ADC-R-AAA(T/G)₁₋₁₁ GGATCCATGGCCTTACGCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---

GCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---
 TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGTAC---

2nd Cycle

GCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCA
 -T(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGT

-T(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGT
 ADC-R-AAA(T/G)₁₋₁₁ GGATCCATGGCCTTACGCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---

GCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCA
GCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---

GCGT--AACCGTTAGTAG-----ATGC--GTACCATG---
 TTT(A/C)₁₋₁₁ CCTAGGTACCGGAATGCGCA--TTGGCAATCATC-----TACG--CATGGTAC---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12M1/00, C12M1/36, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12M1/00, C12M1/36, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 9-313163, A (The Institute of Physical and Chemical Research), 9 December, 1997 (09. 12. 97), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	1-10
Y	JP, 8-070898, A (Hitachi, Ltd.), 19 March, 1996 (19. 03. 96), Full text ; Figs. 4, 5 & EP, 701001, A & CN, 1127887, A	1-10
Y	Jagannath B. Lamture, et al., "Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device" Nucleic Acids Research (1994), Vol. 22, No. 11, p.2121-2125	1-10
Y	JP, 7-303468, A (The Perkin Elmer Corp.), 21 November, 1995 (21. 11. 95), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* "A" Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
26 April, 1999 (26. 04. 99)

 Date of mailing of the international search report
11 May, 1999 (11. 05. 99)

 Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁺ C12N15/00, C12M1/00, C12M1/36, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁺ C12N15/00, C12M1/00, C12M1/36, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 9-313163, A (理化学研究所) 9. 12月, 1997 (09. 12. 97) 全文, 第I図 (ファミリーなし)	1-10
Y	J P, 8-070898, A (株式会社日立製作所) 19. 3月, 1996 (19. 03. 96) 全文, 第4図, 第5図 & EP, 701001, A & CN, 1127887, A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)